

LUCIFERASES**Publication number:** JP9510610 (T)**Publication date:** 1997-10-28**Inventor(s):****Applicant(s):****Classification:**

- international: C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N15/53; C12N5/10; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; G01N33/50; C12R1/19; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N15/53; C12N5/10; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; G01N33/50; (IPC1-7): C12N1/21; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/02; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; C12R1/19; C12R1/19; G01N33/50

- European: C12N9/02K

Application number: JP19950524486T 19950322**Priority number(s):** GB19940005750 19940323; GB19950001170 19950120; WO1995GB00629 19950322**Also published as:**

-  WO9525798 (A1)
-  US6132983 (A)
-  RU2192467 (C2)
-  NO319706 (B1)
-  JP2010088440 (A)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 9510610 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 9525798 (A1)**

Proteins are provided having luciferase activity with greater heat stability than wildtype luciferases by replacing the glutamate equivalent to that at position 354 of *Photinus pyralis* luciferase or 356 of *Luciola* luciferases with an alternative amino acid, particularly lysine. DNA, vectors and cells that encode for and express the proteins are also provided as are test kits and reagents for carrying out luminescence assays using the proteins of the invention. Preferred proteins have a second replaced amino acid at a position equivalent to position 215 of *Photinus pyralis* luciferase or 217 of *Luciola* luciferases.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-510610

(43)公表日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I		
C 12 N 15/09	Z NA	9282-4B	C 12 N 15/00	Z NAA	
1/21		9282-4B	1/21		
5/10		9359-4B	9/02		
9/02		7823-4B	C 12 Q 1/66		
C 12 Q 1/66		7823-4B	1/68	A	
					審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平7-524486
(86) (22)出願日	平成7年(1995)3月22日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)9月20日
(86)国際出願番号	P C T / G B 9 5 / 0 0 6 2 9
(87)国際公開番号	W O 9 5 / 2 5 7 9 8
(87)国際公開日	平成7年(1995)9月28日
(31)優先権主張番号	9 4 0 5 7 5 0 . 2
(32)優先日	1994年3月23日
(33)優先権主張国	イギリス (G B)
(31)優先権主張番号	9 5 0 1 1 7 0 . 6
(32)優先日	1995年1月20日
(33)優先権主張国	イギリス (G B)

(71)出願人	イギリス国 イギリス国、ハンプシャー・ジー・ユー・ 14・6・ティ・ディ、フーンボロー、デ イフエンス・イバリュエイション・アン ド・リサーチ・エージエンシー (番地な し)
(72)発明者	ロウ、クリストファー・ロビン イギリス国、ケンブリッジシャー・シー・ ビー・2・1・キュー・ティー、ケンブリ ッジ、テニス・コート・ロード、ユニバー シティ・オブ・ケンブリッジ (番地なし)
(74)代理人	弁理士 川口 義雄 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ルシフェラーゼ

(57)【要約】

Photinus pyralis ルシフェラーゼの354位またはLuciola 属ルシフェラーゼの356位に位置するグルタミン酸と同等のグルタミン酸を代替アミノ酸、特にリシンで置換することにより、野生型ルシフェラーゼよりも高い熱安定性をえたルシフェラーゼ活性保有タンパク質を提供する。本発明のタンパク質をコードし、また発現させるDNA、ベクター及び細胞、並びに本発明のタンパク質を用いる発光アッセイの実施のための試験キット及び試薬も提供する。好ましいタンパク質は、Photinus pyralis ルシフェラーゼの215位またはLuciola 属ルシフェラーゼの217位と同等の位置に第二の置換アミノ酸を有する。

【特許請求の範囲】

1. ルシフェラーゼ活性を有し、かつPhotinus pyralis、Luciola mingrellica、Luciola cruciataまたはLuciola lateralis由来のルシフェラーゼに対して60%を越えるアミノ酸配列相同性を有するタンパク質であって、Photinus pyralisルシフェラーゼの残基354またはLuciola mingrellica、Luciola cruciata及びLuciola lateralisルシフェラーゼの残基356に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とするタンパク質。
2. アミノ酸配列XGDDKPGを含み、この配列中のXはグルタミン酸以外のアミノ酸残基であることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。
3. アミノ酸配列TPXGDDKPGを含み、この配列中のXはグルタミン酸以外のアミノ酸残基であることを特徴とする請求項2に記載のタンパク質。
4. アミノ酸Xがグリシン、プロリンまたはアスパラギン酸でないことを特徴とする請求項1から3のいずれか1項

に記載のタンパク質。

5. アミノ酸Xがトリプトファン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びアスパラギンのうちのいずれかであるか、またはこれらのアミノ酸のうちのいずれかの類似体または修飾体であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載のタンパク質。
6. アミノ酸Xがリシン及びアルギニンのいずれか一方であるか、またはこれらのアミノ酸の類似体または修飾体であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載のタンパク質。
7. 配列番号2に示したアミノ酸配列を含み、前記配列中のXaaは請求項5または6に記載のアミノ酸またはその類似体もしくは修飾体であるタンパク質。
8. 請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするDNA。
9. 配列番号1に示したヌクレオチド配列を含み、前記配列の1063～1065位の3個の塩基Nはグルタミン酸以外のアミノ酸をコードするコドンを構成す

ることを特徴とする請求項8に記載のDNA。

10. 前記コドンが請求項5または6に記載のアミノ酸、

類似体または修飾体をコードすることを特徴とする請求項9に記載のDNA。

11. 請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするluc遺伝子を含むベクター。

12. 野生型または組み換えluc遺伝子を含むベクターを、Photolais pyralisルシフェラーゼの354位のグルタミン酸またはLuciolamingrellica、LuciolacrucciataもしくはLuciolalateralisルシフェラーゼの356位のグルタミン酸をコードするコドンを代替アミノ酸、該アミノ酸の類似体、または該アミノ酸の修飾体をコードするコドンに変更する部位特異的突然変異誘発によって処理することにより取得可能であることを特徴とする請求項11に記載のベクター。

13. 代替アミノ酸が請求項5または6に記載のアミノ酸、類似体または修飾体であることを特徴とする請求項12に記載のベクター。

14. 内部にluc遺伝子が連結された、pKK223-3、pDR540及びpT7-7の中から選択されることを特徴とする請求項9から13のいずれか1項に記載のベ

クター。

15. 請求項8から14のいずれか1項に記載のDNAまたはベクターを保有する、請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質を発現させ得る細胞。

16. 大腸菌、S. cerevisiaeまたは昆虫細胞であることを特徴とする請求項15に記載の細胞。

17. ATP測定によるアッセイを実施するための試験キットであって、発光試薬中に存在する請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質を含むことを特徴とするキット。

18. 光を発生するルシフェリン及びルシフェラーゼを用いてATPを測定するアッセイ方法であって、前記光の量はATPの量に関連し、ルシフェラーゼが請

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のタンパク質であることを特徴とする方法。

19. アッセイを 30 ~ 70 °C の温度で行なうことを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

20. アッセイを 37 ~ 60 °C の温度で行なうことを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

21. アッセイを 40 ~ 50 °C の温度で行なうことを特徴

とする請求項 18 に記載の方法。

22. 熱安定化剤の不在下に室温で 10 日間貯蔵後にそのルシフェラーゼ活性を 85 % 以上維持しているルシフェラーゼ調製物。

23. 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項または請求項 22 に記載のルシフェラーゼの、特異的結合試薬のためのラベルとしての使用。

24. 請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のルシフェラーゼで標識した特異的結合試薬を含むことを特徴とする試験キット。

25. 細胞または D N A の同定のための、請求項 8 から 14 のいずれか 1 項に記載のルシフェラーゼコーディング D N A またはベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

ルシフェラーゼ

本発明は、ルシフェラーゼ活性を有する新規なタンパク質、及び該タンパク質の発現をコードするDNA及びベクターに係わる。本発明は特に、30°Cを越える温度下で熱安定性を有するルシフェラーゼを提供する。

ホタルルシフェラーゼは、ATP、Mg²⁺及び酸素分子の存在下にルシフェリンの酸化を触媒し、その結果光を発生させる。この反応の量子収率は約0.88であり [De Luca及びMcCleroy (1978) 並びにSeiliger及びMcCleroy (1960) 参照]、上記発光特性はATPレベルを測定する発光測定 (luminometric) アッセイで用いられている。

ルシフェラーゼはホタルまたはツチボタルといった昆虫の体から直接取得可能であり、あるいはまた該酵素をコードする組み換えDNA構築物を保有する微生物からの発現によって取得可能である。この酵素を取得できる、またはこの酵素をコードするDNAを得ることができる四つの重要なホタル種は、日本のゲンジボタル *Luciola cruciata* 及びヘイケボタル *Luciola lateralis*、東ヨーロッパのホタル *Luciola mingrelica*、並びに北アメリカのホタル (*Photinus pyralis*) である。ツチボタル *Lampyris noctiluca* もルシフェラーゼ供給源の一つであり、そのルシフェラーゼのアミノ酸配列は *Photinus pyralis* のものに対して84%の相同意を有する。

野生型ルシフェラーゼ及び組み換えルシフェラーゼの熱安定性は、これらのルシフェラーゼを30°Cを越える、特に35°Cより高い温度に曝露するとその活性がきわめて急激に失われるようなものである。このような不安定性は、上記酵素を高い周囲温度の下で使用もしくは貯蔵する場合、または加熱によって反応速度を高めなければならない場合当該酵素の欠点となる。日本ホタルのルシフェラーゼをその217位において突然変異させてトレオニン残基をイソロイシン残基によって置換すれば該ルシフェラーゼを熱失活に対して安定化できることが知られ

ている (Kajiyama及びNakano, Biochemistry 32, pp. 13795-13799, 1993)。上記のようにして、酵素の熱及びpH安定性並びに比活性

が高められた。Photinus pyralis及びLuciola mingrelicaの熱安定化は未だ報告されていない。

本発明者はここに、Photinus pyralis、Luciola mingrelica、Luciola lateralis及びLuciola cruciataのいずれもが保存する配列中に存在するグルタミン酸 (glutamate) 残基を代替アミノ酸、特にリシンまたはアルギニンで置換することによって、野生型ルシフェラーゼより高い熱安定性を有する新規なルシフェラーゼを提供する。上記グルタミン酸はPhotinus pyralisルシフェラーゼの354位に見出されるもので、前記種及び他の種のルシフェラーゼ中に見出される保存アミノ酸配列T P E G D D K P G Aの3番目のアミノ酸である。

即ち、本発明はその第一の態様において、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質で、Photinus pyralis、Luciola mingrelica、Luciola cruciataまたはLuciola lateralisのそのようなタンパク質に対して60%

を越えるアミノ酸配列相同性を有するタンパク質を提供しこのタンパク質はPhotinus pyralisルシフェラーゼの残基354またはLuciola mingrelica、Luciola cruciata及びLuciola lateralisルシフェラーゼの残基356に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とする。

上記アミノ酸は天然アミノ酸であっても、また天然アミノ酸の修飾体や天然アミノ酸の類似体といったいわゆる非一般的アミノ酸であってもよい。グルタミン酸以外のアミノ酸の類似体とは、タンパク質への作用において元のアミノ酸と同等である化合物のことであると理解される。典型的な非一般的アミノ酸は、“U

S and European Patent in Manuals and
the Rules of Practice in Patent Case
s: application disclosures containing
nucleotide and/or amino acid sequences:
modified and unusual amino acids
"に示されているものであ

る。

好ましくは、本発明のタンパク質はアミノ酸配列 X G D D K P G A を含み、この配列中の X はグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とする。更に好ましくは、本発明のタンパク質はアミノ酸配列 T P X G D D K P G A を含み、その際 X は熱安定性の観点から、アスパラギン酸、プロリンまたはグリシン以外の任意のアミノ酸であることが好ましい。更に好ましくは、X はトリプトファン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはアスパラギンであるが、リシンもしくはアルギニンまたはそのいずれかの類似体であれば最も好ましい。

上記保存 T P X G D D K P A 領域中 1 個または 2 個のアミノ酸が相違するルシフェラーゼを有し得る種は幾つか存在するが、前記配列の 3 位のアミノ酸がグルタミン酸でないように改変されたルシフェラーゼに対応する活性タンパク質は総て本発明により提供されることは明らかである。

本発明の好ましい態様において、本発明のタンパク質は、L u c i o l a 属ホタルルシフェラーゼのアミノ酸 217 または P h o t i n u s p y r a l i s ルシフェラーゼのアミノ酸 215 に対応する位置のアミノ酸が、ヨーロッ

パ特許出願公開第 0524448 号に開示されているような疎水性アミノ酸、好ましくはイソロイシン、ロイシンまたはバリンに変更されたアミノ酸を有する。このような変更を行なうと、354 位の変更のみの場合よりも熱安定性が向上することが判明した。即ち、これら二つの変更は実質的に互いに独立で、しかも併用可能な効果を有する。

本発明は第二の態様において、本発明のタンパク質をコードする D N A を提供

し、また第三の態様では、本発明のタンパク質を発現し得るような形態を有する、*luc* 遺伝子（ルシフェラーゼをコードする遺伝子）を含むベクター、特にプラスミドを提供する。上記のような形態とはベクターが本発明のタンパク質の発現を制御し得るDNA配列を、微生物宿主細胞への導入時に前記タンパク質が、必要であれば適当な誘導物質の添加により、必要に応じて容易に発現され得るよう含む形態のことである。

Photinus pyralis、*Luciola mingrelica*、*Luciola cruciata*及び*Luciola lateralis*の*luc* 遺伝子はいずれも公知であり、かつ標準的な分子生物学的技術で単離可能である。*Photinus pyralis* の

luc 遺伝子は *Promega* から、プラスミド pGEM として市販されている。即ち、本発明のDNAの調製に用いる出発物質を得るのに好ましい方法及び供給源は、(i) 天然のホタルゲノムDNAを用い、このDNAから得た*luc* 遺伝子を、例えばPCRを用いて増幅すること、(ii) pGEM、及び(iii) Kajiyama 及び Nakano の pGL f37 プラスミドである。ルシフェラーゼ活性、即ちルシフェリンを酸化させて発光を実現する活性を有するタンパク質をコードする更に別の遺伝子も、本発明のDNAを得、かつ遺伝子発現によって究極的に本発明のタンパク質を得るための出発物質の適当な供給源である。

本発明のDNAを調製するべく野生型または他の種類の*luc* 遺伝子を操作する上で用いるのに適したベクターは、天然グルタミン酸の代替アミノ酸への改変が行なわれる一方で、DNAを内部に含み得る任意のベクターである。例えばヒドロキシルアミンなどの薬剤を用いて化学的に誘発される突然変異の場合、ベクターは特に重要でなく、突然変異誘発過程前後の遺伝子操作を容易にする適当なベクターは当業者であれば多數想起できよう。

luc 遺伝子を前記グルタミン酸において特異的に突然変異させることが好ましく、即ち部位特異的突然変異誘発操作が必要となる。この操作はベクターにお

いて最も容易に実施でき、当業者にも良く知られている。

野生型、及び公知の *luc* 遺伝子、並びに本発明の *luc* 遺伝子の発現に適したベクターには、pKK223-3、pDR540 (Boehringer Mannheim から入手可能) 及び pT7-7 が含まれる。先の 2 種は、発現がイソプロピル-チオガラクトシド (IPTG) の存在によって誘発されることを可能にするラクトースリプレッサーの制御下に *tac* プロモーターを有する。pT7-7 は T7 RNA ポリメラーゼプロモーターによる制御を可能にし、即ち T7 RNA ポリメラーゼを有する大腸菌細胞におけるきわめて高レベルの遺伝子発現の基礎となる。これらのベクターうちで、pT7-7 ベクターに *luc* 遺伝子を挿入した場合に発現が最高となることが判明した。

pKK223-3 及び pDR540 に挿入された *luc* 遺伝子由来のルシフェラーゼの発現は野生型 N 末端配列ルシフェラーゼの発現をもたらし、一方 pT7-7 に挿入さ

れた *luc* 遺伝子の発現は余分の N 末端アミノ酸 M - A - R - I - Q との融合タンパク質の合成をもたらす。 *luc* 遺伝子を含有するベクター（構築物 pPW204、pPW116 及び pPW304 と呼称する）それぞれにおける *luc* 遺伝子のリボソーム結合部位及び開始コドンを、実施例の表 1 に示す。

本発明はその第三の態様において、本発明のタンパク質を発現させ得る細胞、該細胞を用いて本発明のタンパク質を製造する方法、並びに本発明のタンパク質を含む試験キット及び試薬を提供する。本発明はまた、ルシフェリン／ルシフェラーゼ試薬を用いて ATP を測定する、当業者に良く知られたアッセイ方法であって、ルシフェラーゼが本発明のタンパク質であることを特徴とする方法も提供する。本発明のルシフェラーゼ調製物は 30 ~ 70°C、特に 37 ~ 60°C、更には 40 ~ 50°C において、野生型ルシフェラーゼ及び組み換え野生型ルシフェラーゼに比較してより熱安定性である。

本発明のタンパク質の発現には、細胞自身の DNA 中にか、または細胞内に導入されたプラスミドなどのベクター中に存在する DNA 配列を用いて異種タンパク質を発現さ

せ得る任意の細胞を用い得る。このような細胞は典型的には、*Saccharomyces cerevisiae* 細胞などの酵母細胞及び大腸菌細胞などの細菌細胞であるが、タンパク質発現という目的に適った宿主生物は当業者ならほかにも多数想起できよう。タンパク質が昆虫タンパク質であるので、昆虫細胞が好ましいともいえる。タンパク質は、天然ルシフェラーゼ及び公知の組み換えルシフェラーゼに類似の構造を有するタンパク質として発現されてもよく、または前記のようなタンパク質と、他のアミノ酸、ペプチド、タンパク質、または他の化学実体、例えば先に触れたM-A-R-I-Q配列との融合体または結合体として発現されてもよい。

或る種の宿主は特定の優先コドンを持ち、例えば細菌は場合によっては酵母とは異なるコドンを用いるので、前記のような宿主に導入するDNAは、所与のアミノ酸に関して当該宿主における発現をより好ましく実現する縮重コドンが得られるように改変すれば有利であり得ることは、当業者には明らかであろう。そのような縮重DNAは当然ながら、本発明のDNAの範囲に含まれる。

大腸菌BL21 (DE3) は適当な宿主の一つで、誘導

性 lacUV5プロモーターの制御下にその染色体に安定に組み込まれたT7 RNAポリメラーゼを有し、即ちこの宿主はpT7-7由来の構築物と適合性である。BL21のような大腸菌B株は、lonプロテアーゼ及びompT外膜プロテアーゼを欠く。これらの欠失は、大腸菌における外来タンパク質の発現及び蓄積を安定化する一助となり得る。先に述べた3種の発現構築物をそれぞれ保有する大腸菌BL21 (DE3) の粗抽出物をアッセイしたところ、最高レベルのルシフェラーゼ発現は構築物pPW304を保有する細胞において実現することが判明した(表2参照)。

本発明の突然変異タンパク質は熱安定性以外の利点も有する。Photinus属354位/Lucio1a属356位のアミノ酸を突然変異させると、いずれのアミノ酸または類似体でグルタミン酸を置換するかに依存してルシフェリンの酸化の際に発せられる光の波長が変化することが判明した。即ち、本発明は、特異的結合物質のラベルとして用いるルシフェラーゼ、またはそのタンパク質産

物が用いられるルシフェリン酸化の際に特定波長の光として自身の存在 (ide
n t i t y) を報告し返すリポーター遺

伝子も提供する。上記のような特性の獲得では、グリシン、プロリン及びアスパラギン酸などを用いる突然変異も利用できる。本発明のタンパク質はまた、その熱安定性が向上することから、後段に例示するように比較的高温、例えば37℃以上の温度の下でも対応して向上した収率で製造可能であるという利点も有する。

本発明のタンパク質、DNA、ベクター及び細胞の一例を、次の非限定的実施例、添付図面、諸表及び配列表を参照しつつ以下に詳述する。別のタンパク質、タンパク質結合体、DNA、ベクター及び細胞、並びにこれらのうちのいずれかを包含するアッセイ及び試験キットも、ここに説明するものに照らせば当業者には想起されよう。

図面の簡単な説明

図1は後述の実施例に記載するluc遺伝子の挿入によってpKK223-3から得たプラスミドpPW204の制限酵素地図である。

図2は後述の実施例に記載するluc遺伝子の挿入によってpDR540から得たプラスミドpPW116の制限酵素地図である。

図3は後述の実施例に記載するluc遺伝子の挿入に

よってpT7-7から得たプラスミドpPW304の制限酵素地図である。

図4はpDR540と、Xho部位を除去したpGEM-luc由来のBamH1/Sst1断片とから得たプラスミドpPW601aの制限酵素地図である。

図5は実施例に後述するように所与の温度で20分間インキュベートした組み換え及び野生型Photorhizus属ルシフェラーゼ(Sigma)の熱失活のグラフである。

図6は異なる温度下で増殖させた大腸菌BL21(DE3)pPW304の粗抽出物中のルシフェラーゼ活性のグラフである。

図7はp PW304及びp PW304M-1(グルタミン酸354がリシンで置換されるようにコードする本発明のプラスミド)に由来するルシフェラーゼ活性の熱失活のグラフである。

図8はSigma野生型、p PW304及びp PW304M-1組み換えルシフェラーゼの37℃での経時失活のグラフである。

図9はTaborから得たpT7-7の制限酵素地図である。

図10は野生型の354位のグルタミン酸がアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グルタミン、ヒスチジン、アスパラギン、メチオニン、アルギニン、リシン、セリン、トレオニン及びシステインでそれぞれ置換されたルシフェラーゼを発現する本発明のルシフェラーゼ発現大腸菌の粗細胞抽出物活性の、40℃のPromega溶解緩衝液中の熱活失を示すグラフである。

図11はE354Kリシン変更及びA215Lロイシン変更を有する精製二重突然変異ルシフェラーゼ活性のリン酸緩衝液中47℃での熱失活を、单一突然変異体A215L及びE354Kと比較して示すグラフである。

図12は0.02%アジドを加えたpH7.75のHEPES緩衝液中37℃におけるリシンE354K突然変異ルシフェラーゼ、組み換え野生型ルシフェラーゼ及び天然ホタルルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の経時変化を示すグラフである。

図13は組み換え野生型、E354K单一突然変異体及びE354K+A215L二重突然変異体の37℃でのルシフェラーゼ発現を、培養細胞密度の尺度としての光学密度

度の上昇をルシフェラーゼ活性に対してプロットすることによって示すグラフである。

図14は1%BSA及び0.02%アジドを含有するpH7.75のHEPES中37℃における、各10ng/mlのA215L单一突然変異、E354K单一突然変異、A215L+E354K二重突然変異、組み換え及びSigma

野生型ルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の5時間にわたる経時変化を示すグラフである。

図15は1%BSA、0.02%アジド、2mM EDTA及び2mM DTを含有するpH7.75のHEPES中37°Cにおける、各10ng/mlのA215L単一突然変異、E354K単一突然変異、A215L+E354K二重突然変異、組み換え及びSigma野生型ルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の5時間にわたる経時変化を示すグラフである。

配列表:

本明細書本文の最後に添付した配列表に、次のDNA及びアミノ酸配列を示す。

配列番号1には、Photinus pyralis野生型の1063～1065位に位置するコドンを突然変異

させた、本発明のルシフェラーゼをコードするDNAのDNA配列を示す。リシンを得るには1063位の塩基をAに突然変異させる。

配列番号2には、Photinus pyralis野生型のアミノ酸354のグルタミン酸を別のアミノ酸に変更した本発明のタンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号3には、実施例2においてpPW601をSDM突然変異させ、それによって354位にグルタミン酸に替えてリシンを得るのに用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す。

配列番号4には、実施例5においてpPW601をSDM突然変異させ、それによって215位にロイシンを得るのに用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す。

配列番号5には、Photinus pyralis野生型のアミノ酸354のグルタミン酸を他の任意のアミノ酸に変更し、かつアミノ酸215をロイシンに変更した本発明のタンパク質のアミノ酸配列を示す。

実施例

実施例1：本発明のDNAを含むプラスミドの作製

Boehringer Mannheimからプラスミ

DKK223-3及びDR540を得た。DR540はPharmaciaからも入手可能である。

マサチューセッツ州、ボストン所在のHarvard Medical School、生物化学部のStan Taborから、プラスミドpT7-7 (Molecular Biology 第II巻, 16. 2. 1. 章のCurrent protocols 参照)を得たが、該プラスミドは、(図8に示されているように) pT7-5のPvuIIとClaI部位の間に挿入されたT7遺伝子10タンパク質 (T7 22857~22972bp) のT7 RNAポリメラーゼプロモーターϕ10及び翻訳開始部位を含んでいる。(5'末端に充填後)融合タンパク質を作製するための单一制限部位は、フレーム0: EcoRI; フレーム1: NdeI, SmaI, ClaI; フレーム2: BamHI, SalI, HindIIIである。元のポリリンカーのSacI部位を欠失により除去し、追加のXbaI部位を開始コドンの上流に設ける。

Sigma Chemical Co. からホタルルシフェラーゼ (カタログ番号 L9009の結晶懸濁液から調製)、補酵素A及びATPを得た。甲虫ルシフェリンカ

リウム塩はPromegaから得た。細胞抽出物をPromegaテクニカルブレティン101号に記載のように調製した。E. coli 培養物の一部を細胞溶解試薬 (25mM トリス-リシン酸、pH 7.8, 2mM DTT, 2mM EDTA, 10%グリセロール、1% トリトンX-100, 2.5mg/ml BSA, 1.25mg/ml リゾチーム) 中で室温で10分間溶解し、次いでアッセイに先立ち、氷上に保存した。

コロニーをナイロンフィルター (Hybond N, Amersham) に移し、次いで該フィルターを、0.5mM ルシフェリンを含有する100mMクエン酸ナトリウム緩衝液pH 5.0 [Wood & DeLuca, (1987) Anal Biochem 161 501-507ページ] に浸して、該コロニー

ーが発光する生物発光をモニターして、細胞系のルシフェラーゼ活性をアッセイした。125μlのアッセイ緩衝液(20mMトリシン、1mM MgSO₄、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、0.27mM 補酵素A、0.47mM ルシフェリン、0.53mM ATP及び1~2μlの試料)を用い、25°Cで、in vitroルシフェラーゼアッセイを実

施した。アッセイカクテルの最終pHは7.8であり、BioOrbit 1250ルミノメーターを用いて光測定を行った。

DNAの非特異的化学突然変異体を作製するために、Kirondel (1989) Biochem. J. 259, 421-426ページの方法に従って、0.1mMリン酸ナトリウムpH6.0中0.8Mヒドロキシルアミン、1mM EDTAを用い、65°Cで2時間、1μc遺伝子を含むプラスミドを処理した。突然変異を起こしたプラスミドをG60 DNAグレードNickカラム(Pharmacia)上で脱塩し、次いで、E. coli BL21 (DE3)に形質転換した。

ルシフェラーゼ活性を有する粗細胞抽出物を種々の温度で20分間インキュベートし、残留活性を測定して、熱失活実験を実施した。Sigmaから得た精製ルシフェラーゼを用いた実験では、失活に先立ち、酵素をPromega溶解緩衝液に希釈した。経時変化実験では、溶解緩衝液中50μlの粗細胞抽出物又はSigmaルシフェラーゼを含むエッペンドルフ管を37°Cでインキュベートした。アッセイに先立ち、種々の時間に管を取り出し、氷上で冷

却した。残留(又は残存)活性は初期の活性の百分率として表した。

各構築物、pPW204、pPW116及びpPW304からのルシフェラーゼの相対的発現レベルは、E. coli BL21 (DE3)では0.1:0.5:1.0である。LB中37°CでOD 600が0.3になるまで細胞を増殖させ、次いで、IPTGにより誘発、4時間増殖を継続させた後、粗抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

表1：実施例1に用いた発現構築物のリボソーム結合部位

(下線) 及び開始コドン

p PW304 AAGGAGATATACAT ATG* CGT AGA ATT CAA ATG
 p PW116 AGGAAACAGGATCCA ATG*
 p PW204 AGGAAACAGCAA ATG*

以下のプロトコルを用い、グルタミン酸を別のアミノ酸に変換するに必要な部位特異的突然変異誘発を実施した。グルタミン酸からリシンへの突然変異は単一 A v a I 制限部位内に存在し、従って該部位を破壊するので、単一のオリゴヌクレオチドを突然変異誘発及び選択オリゴヌクレオ

チドとして用いることが可能である。

部位特異的突然変異誘発プロトコル：

選択したプラスミドをリシン用の選択／突然変異誘発オリゴヌクレオチド：5' - CATCCCCCTTGGGTGTAATCAG - 3' [下線を付したTは不適正（ミスマッチ）塩基である]で変性・アニーリングする。突然変異DNA鎖を合成、連結し、一次制限部位全体をA v a Iで消化する。

B i o - R a d G e n e P u l s e r 2 - 8 9型を用い、細胞、この場合はE. c o l i B M H 7 1 - 1 8 突然変異S細胞への形質転換を実施した。収穫した細胞と、突然変異を起こしたプラスミド及び親プラスミドを含む精製混合プラスミドプールとを得、A v a Iによる二次制限消化を実施して、E. c o l i J M 1 0 9 細胞に形質転換した。これらの細胞を選択培地 (L B 寒天 + 5 0 μg / ml アンピシリン) 上に置き、クローンのプロニラスミドDNAを精製し、A v a I 制限部位の欠損を分析してクローンのスクリーニングを行った。いずれの場合にも、B i r n b o i m 及び D o l y (1 9 7 9) N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 7, 1 5 1 3 ページのアルカリ溶解法を用いてプラスミドDNAを精製した。厳密なプロ

トコルは、C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s I n c (U S) から

カタログ番号K1600-1として販売されている、**Transformer^{RT}**

™部位特異的突然変異誘発キット（バージョン2）に記載の通りであった。

Pharmacia pDR540と、Xho部位が破壊されたpGEM-1
ucからのBamHI/SstIフラグメントとから誘導されたpPW116の
変異体であるpPW601aの制限地図を図4に示す。上記のように、Colon
techの指示に従って、挿入された野生型Photinusのluc遺伝子を
、発現されたタンパク質のアミノ酸配列が配列番号2に示されているように35
4位でリシンに改変されている配列番号1（1063-1065はAAGである
）に示されている配列に変換するように部位特異的突然変異誘発を実施した。

実施例2：ルシフェラーゼの熱安定性

E.coliにおいて上記のように作製されたベクター中の非改変及び改変（
即ち、本発明の）luc遺伝子によって発現された種々のルシフェラーゼの熱安
定性を測定し、結果を図5～図8に示す。

50 mM リン酸カリウム緩衝液pH7.8、1 mM EDTA、0.2% (w
/v) BSA、1 mM DTT及び10% 硫酸アンモニウム中、43.5°Cで5
0 μg/mlのルシフェラーゼ活性の $t^{1/2}$ (半減期) の比較は、以下のような
時間で到達する残留50%活性を示す。

$\frac{t^{1/2}}{\text{ }} \text{ }$

Sigma 野生型ルシフェラーゼ：約1.5分で到達
pPW601 (354 = グルタミン酸)：約5分で到達
pPW601aK (354 = リシン)：約30分で到達

上記数値から明らかなように、354グルタミン酸をリシンで置換すると、ル
シフェラーゼの熱安定性が少なくとも43.5%まで増大することがわかる。

実施例3：ルシフェラーゼの熱安定性

E.coliにおいて実施例1に記載のものと類似の方法で作製したベクター
中の本発明の他の354位突然変異に対応するSDM改変luc遺伝子により発
現された多くのルシフェラーゼの熱安定性を測定し、結果を図10にグラフで示
す。

Pr o m e g a 溶解緩衝液中 40°C で $t^{1/2}$ の比較を行い、以下のような $t^{1/2}$ (分) の結果を得た：

	$t^{1/2}$
p PW601aK (354=リシン) :	約13分で到達
p PW601aR (354=アルギニン) :	約13分で到達
p PW601aL (354=ロイシン) :	約10分で到達
p PW601aI (354=イソロイシン) :	約10分で到達
p PW601aN (354=アスパラギン) :	約10分で到達
p PW601aV (354=バリン) :	約9分で到達
p PW601aW (354=トリプトファン) :	約8分で到達
p PW601aA (354=アラニン) :	約6.5分で到達
p PW601aY (354=チロシン) :	約6.5分で到達
p PW601aM (354=メチオニン) :	約5.5分で到達
p PW601aF (354=フェニルアラニン) :	約5分で到達
p PW601aH (354=ヒスチジン) :	約5分で到達
p PW601aT (354=トレオニン) :	約4.5分で到達
p PW601aQ (354=グルタミン) :	約4.5分で到達
p PW601aC (354=システイン) :	約4分で到達
p PW601aS (354=セリン) :	約3.5分で到達
p PW601aE (354=グルタミン酸) :	約1分で到達
p PW601aD (354=アスパラギン酸) :	約1分で到達
p PW601aP (354=プロリン) :	約1分で到達
p PW601aG (354=グリシン) :	約<1分で到達

実施例4：37°C及び室温でのルシフェラーゼの安定性

p PW601Kリシン突然変異ルシフェラーゼ (86ng/ml)、組換え野生型ルシフェラーゼ (550ng/ml) 及び天然型ルシフェラーゼ (Sigma) (62.

5ng/ml) を、1% BSA、保存剤として0.02%アジドを含むpH7

75 HEPES緩衝液中37°Cで4時間インキュベートした。残留活性を測定するために、D-ルシフェリン基質に1ngのルシフェラーゼを加え、1分当たりの発光カウント数を記録した。

37°Cで2時間、室温で10日間インキュベートした後の残留活性に関する結果を以下に示す。

37°Cで2時間後：

E354K突然変異ルシフェラーゼ 残留活性70%

組換え野生型ルシフェラーゼ 残留活性12%

Sigma天然ルシフェラーゼ 残留活性18%

室温で10日後：

E354K突然変異ルシフェラーゼ 残留活性85%

組換え野生型ルシフェラーゼ 残留活性59%

Sigma天然ルシフェラーゼ 残留活性71%

実施例5：354K：215L二重突然変異体の作製及び安定性

実施例1に記載のように、pPW601a E354Kを得、これを、配列番号4のオリゴヌクレオチド、5'-GAATCTGACGCAGAGAGTTCTATGCGG-3'〔下線を付した塩基は突然変異を引き起こす不適正（ミスマッチ）塩基を表す〕

を用いて突然変異を起こさせ、pPW601a Photinus pyralisルシフェラーゼの354リシン：215ロイシン二重突然変異体を作製した。熱失活媒体として1mM EDTA、0.2% (w/v) BSA、1mM DTT及び10%硫酸アンモニウムを含むpH7.8リン酸緩衝液を用い、実施例2から4に記載のようにして、実施例1に記載のものと類似の方法によりEcoli中で発現させて得られたルシフェラーゼのDNA配列決定及び熱安定性の測定によりこの突然変異体を確認した。

リン酸緩衝液中43.5°Cでは、32分間にわたる活性の損失は5%未満であったのに対し、47°Cでは、 $t^{1/2}$ は約38分であった。50°Cでは、二重突然変異体は、16分間のインキュベーション後に15%の活性を保持している。この失活テストの結果を図12にグラフで示す。

実施例6：ルシフェラーゼの精製

組換え野生型又は突然変異ルシフェラーゼを発現する *E. coli* JM109細胞を、 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む *Luria-Broth* (LB) 中 30°C で増殖させ、初期対数増殖期の間に IPTG (1 mM) により誘発させた。中間の静止期に細胞を収穫し、 $50\text{ mM K$

C1、 1 mM ジチオトレイトール、 $1\text{--}2\text{ mM}$ フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 及び 1 mM EDTA を含む 50 mM トリス-HCl pH 8.0 (緩衝液A) に再懸濁した。MSE soniprep 150 音波処理装置 (振幅: $14\text{ }\mu$) 中で細胞を破壊し、細胞溶解物を $30\text{,000}\times g$ で 30 分間遠心した。次いで、粗抽出物の上清を硫酸アンモニウムで分画し、 $35\text{--}55\%$ 飽和の間に沈殿した画分が、ルシフェラーゼ活性を含むことが見いだされ、緩衝液Aに溶解した。

0.5 mM DTT を含む 50 mM トリス-HCl pH 8.0 (緩衝液B) 中で平衡にした Pharmacia PD10 カラムを用いて抽出物を脱塩し、脱塩抽出物を Pharmacia Mono Q アニオン交換カラムにかけ、緩衝液B中 $0\rightarrow 500\text{ mM}$ の直線勾配の NaCl を用い流速 $4\text{ mL}/\text{分}$ で 2 mL の画分として溶離した。ルシフェラーゼ活性のピーク画分を捕集し、長期保存するために、 0.5 mM DTT 及び 12% (v/v) グリセロールを含む 25 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 に溶解した。

実施例7：精製ルシフェラーゼの熱失活

実施例6に記載のように、ルシフェラーゼの無細胞抽出物を含むエッペンドルフ管を準備した。精製したルシフェラーゼ調製物 ($50\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$) を、 10% 飽和硫酸アンモニウム、 1 mM ジチオトレイトール及び 0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.8 からなる熱安定性緩衝液中でインキュベートした。アッセイに先立ち、設定時間に管を取り出して氷/水浴中で冷却し、定量残留活性を初期活性の百分率として計算した。

$42\text{--}50^{\circ}\text{C}$ の温度範囲にわたって熱安定性緩衝液中での失活の半減期を測定

して、精製された組換え野生型及び熱安定性ルシフェラーゼのアウレニウスプロットを作成した。次いで、 $t^{1/2}$ (分) の自然対数値を $1/K$ に対してプロットした。等しい失活率に対して、E 354K 突然変異体はこの範囲の温度で熱安定性を 2°C 上昇させるのに対し、A 215L 突然変異体は 5°C 上昇させ、二重突然変異体 E 354K + A 215L は 6°C 上昇させる。後者は、二重突然変異体の附加的性質を示している。

実施例 8 : E. coli において野生型組換えルシフェラーゼに比べて増大した突然変異ルシフェラーゼの発現

E. coli JM109 細胞におけるルシフェラーゼの発現を液状培地中 37°C での増殖中にモニターした。増殖中に、熱安定性突然変異体を発現する細胞は、組換え野生型酵素を発現する細胞に比べてより高い活性のルシフェラーゼを蓄積することが判明した。図 13 は、組換え野生型、E 354K + A 215L 二重突然変異体及び E 354K の培養物について、600 nm で増大する光学密度に対してルシフェラーゼ活性をプロッティングした際の上記作用をグラフで示している。单一及び二重突然変異体の熱安定性が増大すると、培養温度 37°C でのルシフェラーゼの產生が増大し得ることがわかる。

実施例 9 : 37°C での突然変異ルシフェラーゼの安定性に対する緩衝液の作用

1% BSA 及び 0.02% アジドを含む HEPES pH 7.75 緩衝液中、A 215L、E 354K、E 354K + A 215L、組換え野生型及び Sigma ルシフェラーゼそれぞれの 10 ng/ml 溶液を調製し、37°C での熱安定性を、2 mM EDTA 及び 2 mM DTT を添加した同一組成物と比較した。結果を図 14 及び図 15 に示す。該結果は、A 215L 及び E 354K の 37°C での相

対安定性が緩衝液によって変化することを示している。

実施例 10 : D-ルシフェリンの酸化により発光した光の波長に対するアミノ酸置換の影響

D-ルシフェリンを実施例 3 に記載の種々の本発明ルシフェラーゼで酸化した

ときに発光した光の波長を測定し、該波長がアミノ酸の突然変異によって変化することを知見した。発光した光の波長は、組換え野生型 (E 354) と E 354 K とでは 5 nm の変化があり、E 354 K と E 354 I とでは約 15 nm の変化があった。

野生型組換え E. coli 微生物は D-ルシフェリンの存在下に黄緑色の発光を示す。D-ルシフェリンを加えた場合の各突然変異 E. coli による発光色は以下の通りであった：

E 354 G	黄緑色
E 354 N	黄緑色
E 354 A	緑色
E 354 V	橙赤色
E 354 M	橙赤色
E 354 F	黄緑色
E 354 L	黄色
E 354 Y	黄緑色
E 354 S	黄緑色
E 354 C	黄緑色
E 354 K	黄色
E 354 Q	黄緑色
E 354 W	黄緑色
E 354 T	黄緑色
E 354 P	橙色
E 354 R	黄橙色
E 354 H	黄緑色
E 354 N	黄色
E 354 I	赤色。

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：1722

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：Genomic DNA

ハイポセティカル：NO

アンチセンス：NO

起源

生物名：Photinus pyralis

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：4..1653

配列

CAAATGGAAG ACGCCAAAAA CATAAAGAAA GGCCCGGCC CATTCTATCC TCTAGAGGAT	60
GGAACCGCTG GAGAGCACT GCATAAGGCT ATGAAGAGAT ACGCCCTGGT TCTGGAAACA	120
ATTCGTTTTA CAGATGCACA TATCGAGGTG AACATCACGT ACGCGGAATA CTTCGAAATG	180
TCCGTTCGGT TGGCAGAACG TATGAAACGA TATGGGCTGA ATACAAATCA CAGAATCGTC	240
GTATGCAGTG AAAACTCTCT TCAATTCTTT ATGCCGGTGT TGGGCGCGTT ATTTATCGGA	300
GTTGCAGTTG CGCCCGCGAA CGACATTTAT AATGAACGTG AATTGCTCAA CAGTATGAAC	360

ATTTCGCAGC CTACCGTAGT GTTGTTCC AAAAAGGGT TGCAAAAAT TTTGAACGTG	420
CAAAAAAAAT TACCAATAAT CCAGAAAATT ATTATCATGG ATTCTAAAAC GGATTACCAG	480
GGATTTCACT CGATGTACAC GTTGTACACA TCTCATCTAC CTCCCGTTT TAATGAATAC	540
GATTTTGAC CAGAGTCCTT TGATCGTAC AAAACAATTG CACTGATAAT GAATTCCCTCT	600
GGATCTACTG GGTTACCTAA GGGTGTGGCC CTTCCGCATA GAACTGCCTG CGTCAGATTC	660
TGCGATGCCA GAGATCCTAT TTTTGGCAAT CAAATCATTC CGGATACTGC GATTTTAAGT	720
GTTGTTCCAT TCCATCACGG TTTTGGATG TTACTACAC TCGGATATTT GATATGTGGA	780
TTTCGAGTCG TCTTAATGTA TAGATTTGAA GAAGAGCTGT TTTTACGATC CCTTCAGGAT	840
TACAAAATTG AAAGTCCGTT CCTAGTACCA ACCCTATTTT CATTCTTCGC CAAAAGCACT	900
CTGATTGACA AATACGATTT ATCTAATTTA CACGAAATTG CTTCTGGGGG CGCACCTCTT	960
TCGAAAAGAAG TCGGGGAAGC GGTTGCAAAA CGCTTCCATC TTCCAGGGAT ACGACAAGGA	1020
TATGGGCTCA CTGAGACTAC ATCAGCTATT CTGATTACAC CCNNNGGGGA TGATAAACCG	1080
GGCGCGGTGCG GTAAAGTTGT TCCATTGTTT GAAGCGAAGG TTGTGGATCT GGATACCGGG	1140
AAAACGCTGG CGGTTAATCA GAGAGCGAA TTATGTCGA GAGGACCTAT GATTATGTCC	1200
GGTTATGTAA ACAATCCGGA AGCGACCAAC GCCTTGATTG ACAAGGATGG ATGGCTACAT	1260
TCTGGAGACA TAGCTTACTG GGACGAAGAC GAACACTTCT TCATAGTTGA CGCGTTGAAG	1320
TCTTTAATTA AATACAAAGG ATATCAGGTG CCCCCCGCTG AATTGGAATC GATATTGTTA	1380
CAACACCCCA ACATCTCGA CGCGGGCGTG GCAGGTCTTC CCGACGATGA CGCCGGTGAA	1440
CTTCCCGCCG CCGTTGTTGT TTTGGAGCAC GGAAAGACGA TGACGGAAAA AGAGATCGTG	1500
GATTACGTCC CCAGTCAAGT AACAAACCGCG AAAAAGITGC GCGGAGGAGT TGTGTTGTG	1560
GACGAAGTAC CGAAAGGTCT TACCGGAAAA CTCGACGCAA GAAAAATCAG AGAGATCCTC	1620
ATAAAGGCCA AGAAGGGCGG AAAGTCCAAA TTGTAAAATG TAACTGTATT CAGCGATGAC	1680
GAAATTCTTA CCTATTGTAA TCCTCCGAGG CCTCGAGGTC GA	1722

配列番号：2

配列の長さ : 5 5 0

配列の型：アミノ酸

銷の数：一本銷

トボロジー；不明

配列の種類：タンパク質

ハナホセテイカル：N°

起 源

生物名 : Photinus pyralis

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：3 5 4

配列

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
 1 5 10 15

Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
 20 25 30

Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
 35 40 45

Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
 50 55 60

Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
 65 70 75 80

Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
 85 90 95

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
 115 120 125
 Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
 130 135 140
 Ile Ile Gln Lys Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
 145 150 155 160
 Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
 180 185 190
 Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205
 Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
 210 215 220
 Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Xaa Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu 465
 470 475 480
 Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495
 Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510
 Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 545 550

配列番号：3

配列の長さ：22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：Genomic DNA

ハイポセティカル：NO

起源

生物名：Photinus pyralis

配列の特徴

特徴を表す記号：miss-. difference

存在位置：置換(10, "",)

配列

CATCCCCCTT GGGTGTAATC AG

22

配列番号：4

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイポセティカル : N O

起源

生物名 : P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号 : m i c s d i f f e r e n c e

存在位置 : 置換 (16..17, " ")

配列

GAATCTGACG CAGAGAGTTC TATGCGG

27

配列番号 : 5

配列の長さ : 550

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 不明

配列の種類 : タンパク質

ハイポセティカル : N O

起源

生物名 : P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：3 5 4

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：2 1 5

配列

Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Phe	Tyr	Pro
1															15
Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Leu	His	Lys	Ala	Met	Lys	Arg
	20								25						30
Tyr	Ala	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Ala	Phe	Thr	Asp	Ala	His	Ile	Glu
		35						40						45	
Val	Asn	Ile	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Phe	Glu	Met	Ser	Val	Arg	Leu	Ala
	50					55						60			
Glu	Ala	Met	Lys	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr	Asn	His	Arg	Ile	Val	Val
	65					70				75				80	
Cys	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Phe	Phe	Met	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Leu
		85					90						95		
Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg
	100						105						110		
Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Asn	Ile	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Val
	115							120					125		
Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Pro
	130					135					140				
Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Lys	Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly	
	145					150				155			160		

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
 180 185 190
 Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205
 Ala Leu Pro His Arg Thr Leu Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
 210 215 220
 Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Xaa Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365
 Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460

Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu
465 470 475 480

Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
485 490 495

Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
500 505 510

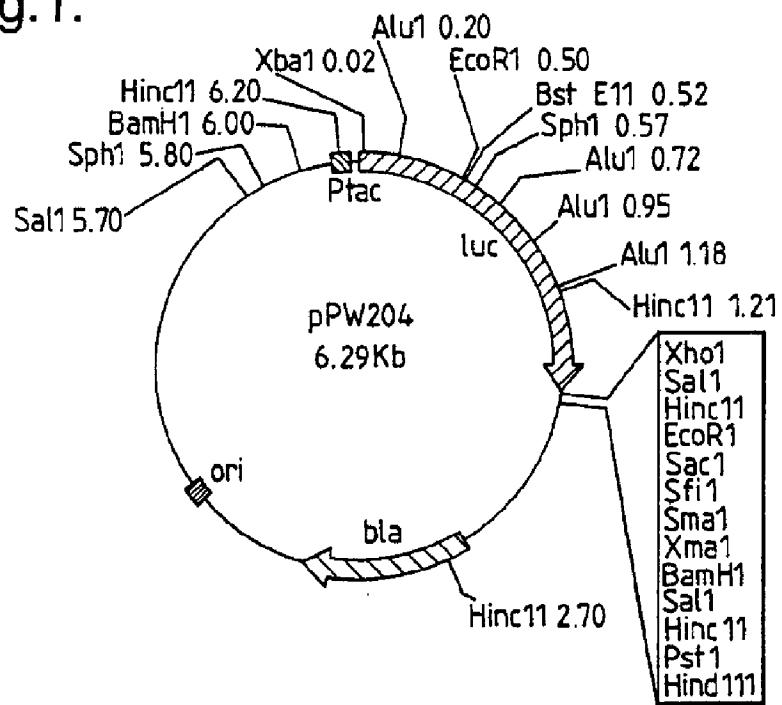
Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
515 520 525

Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
530 535 540

Gly Gly Lys Ser Lys Leu
545 550

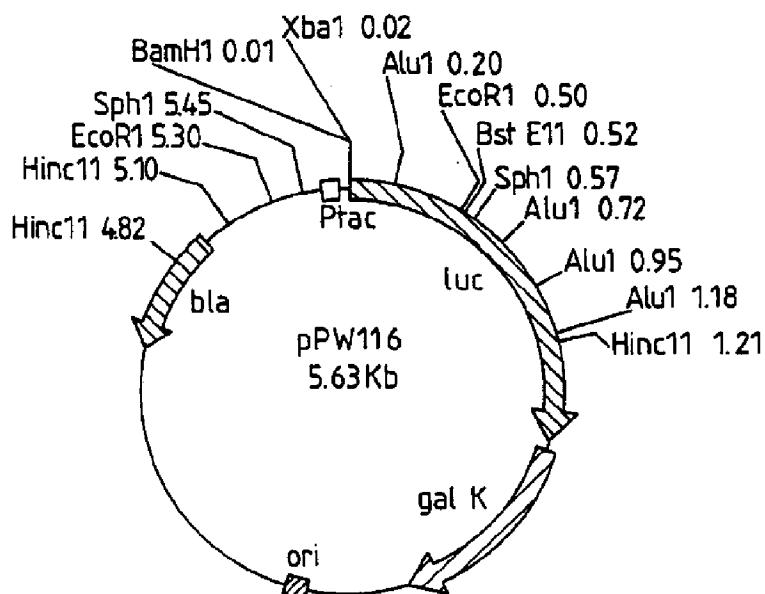
【図1】

Fig.1.



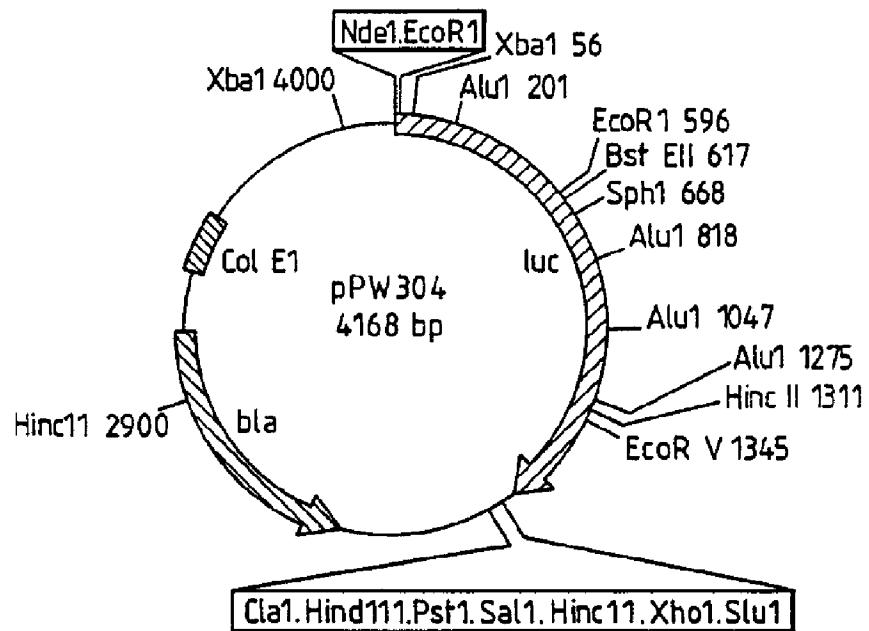
【図2】

Fig.2.



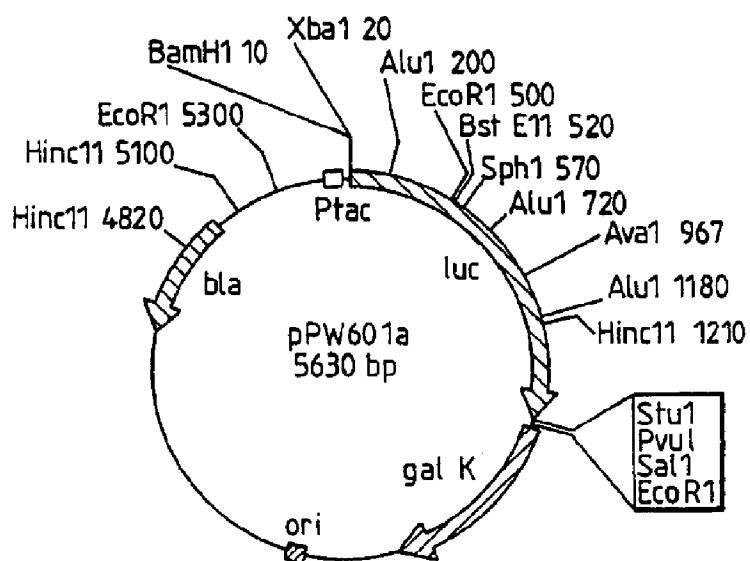
[図3]

Fig.3.

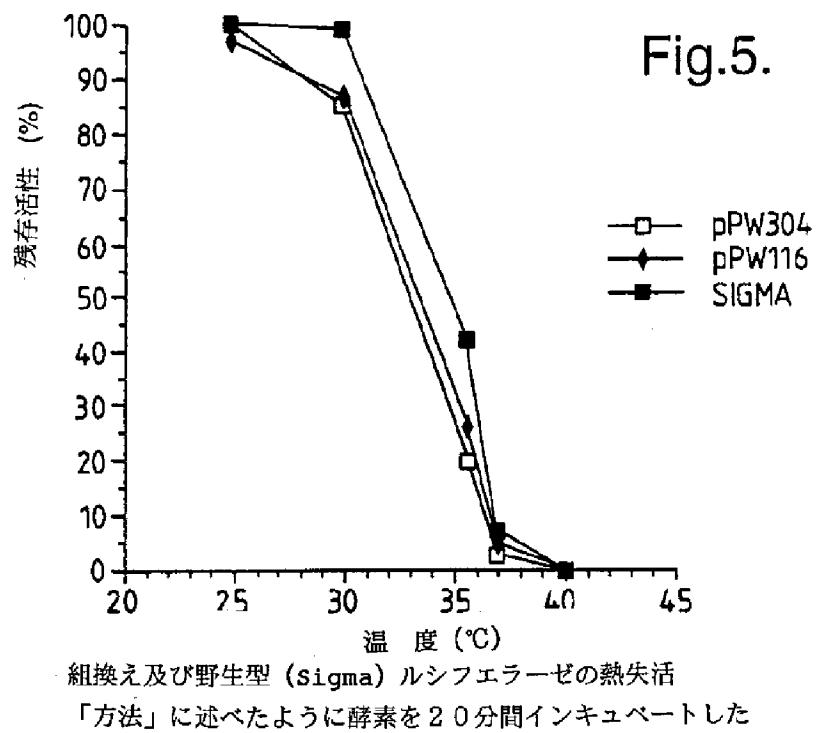


【図4】

Fig.4.

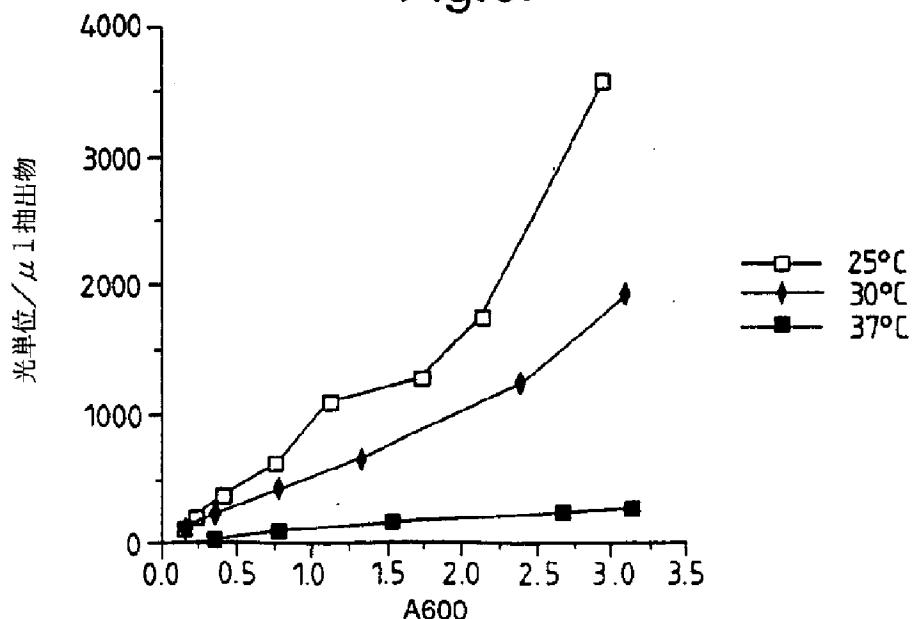


【図5】



【図6】

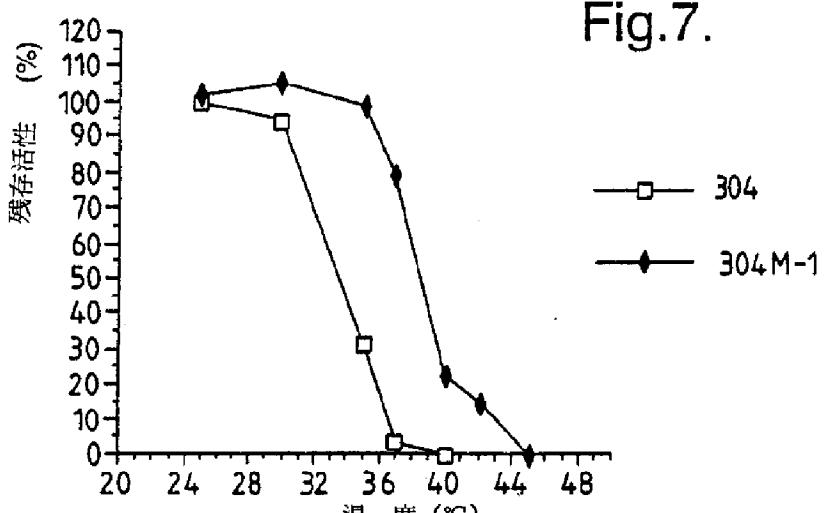
Fig.6.



異なる温度下で増殖させた大腸菌BL21 (DE3) pPW304の粗抽出物中のルシフェラーゼ活性

【図7】

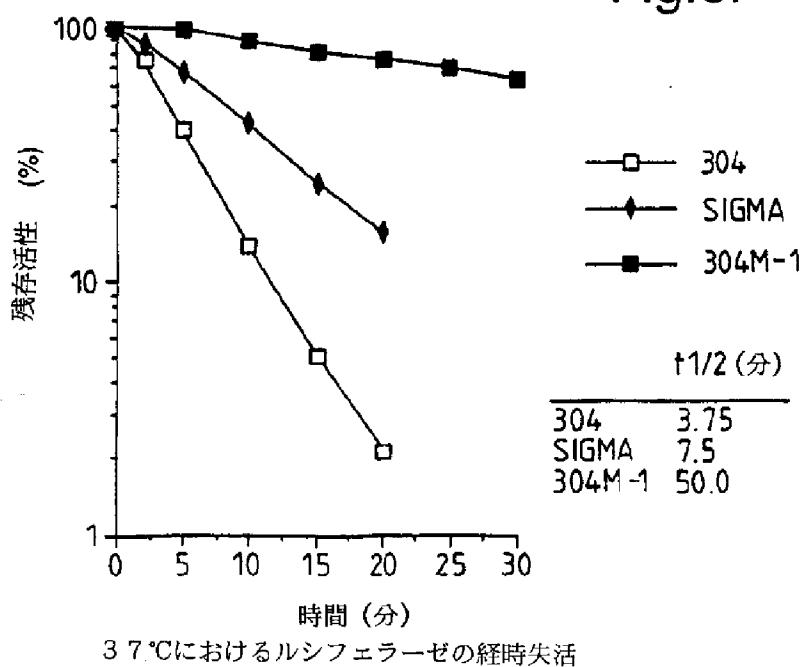
Fig.7.



ルシフェラーゼ304及び304M-1の熱失活
「方法」に述べたように酵素を20分間インキュベートした

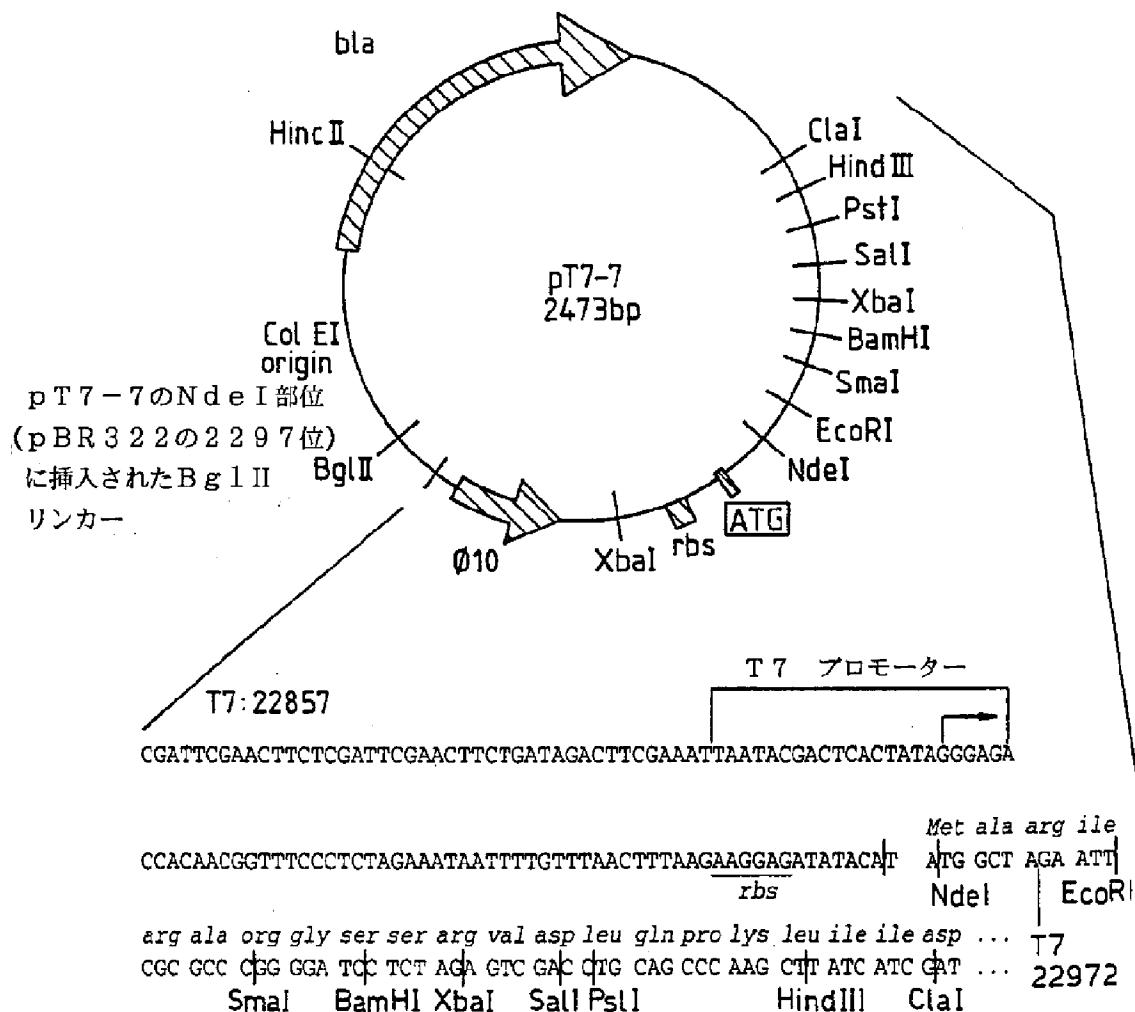
【図8】

Fig.8.



【図9】

Fig.9.



【図10】

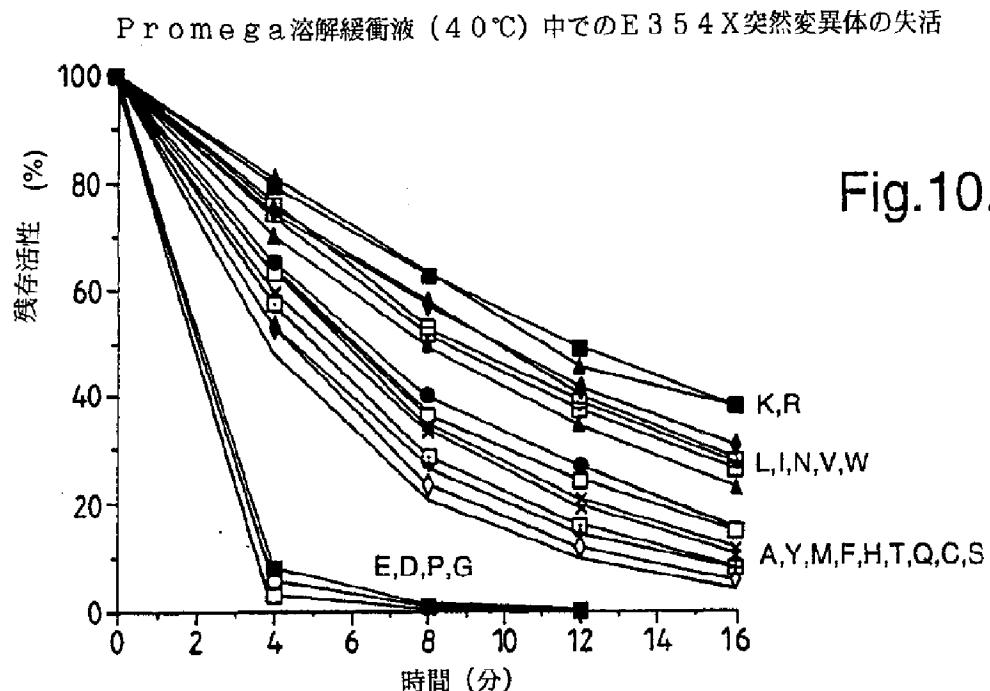


Fig.10.

【図11】

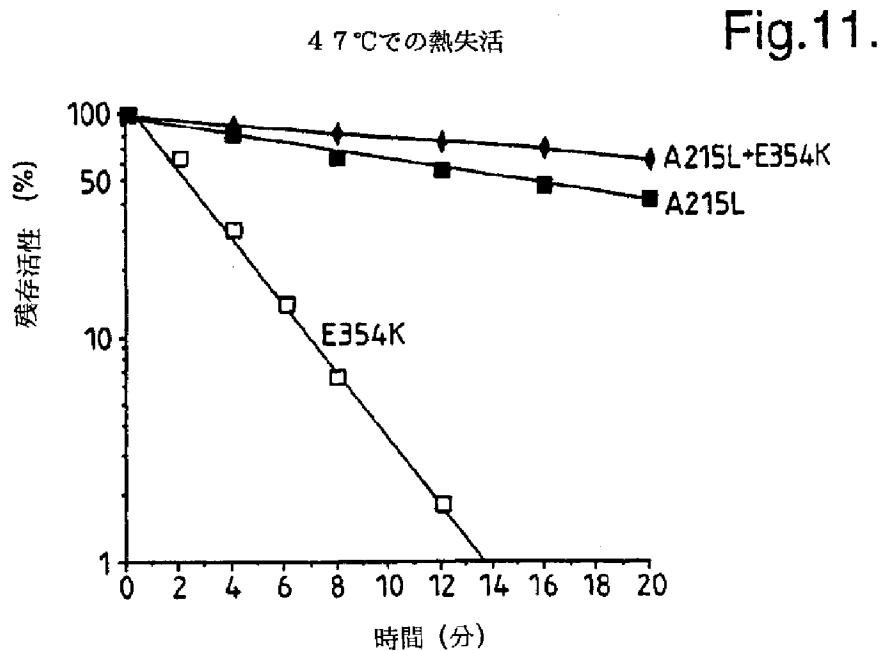
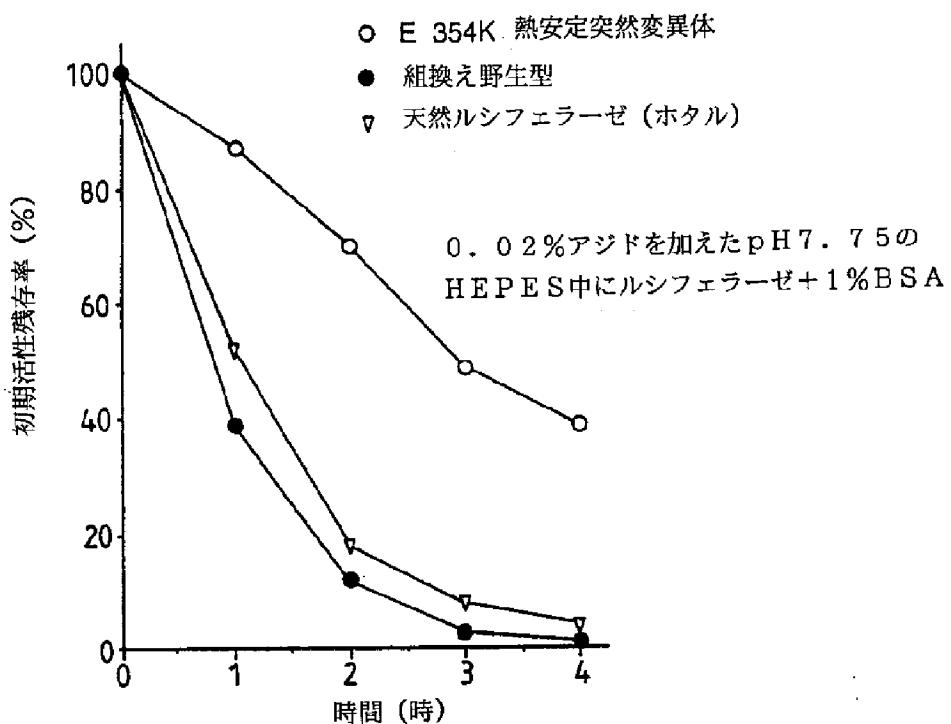


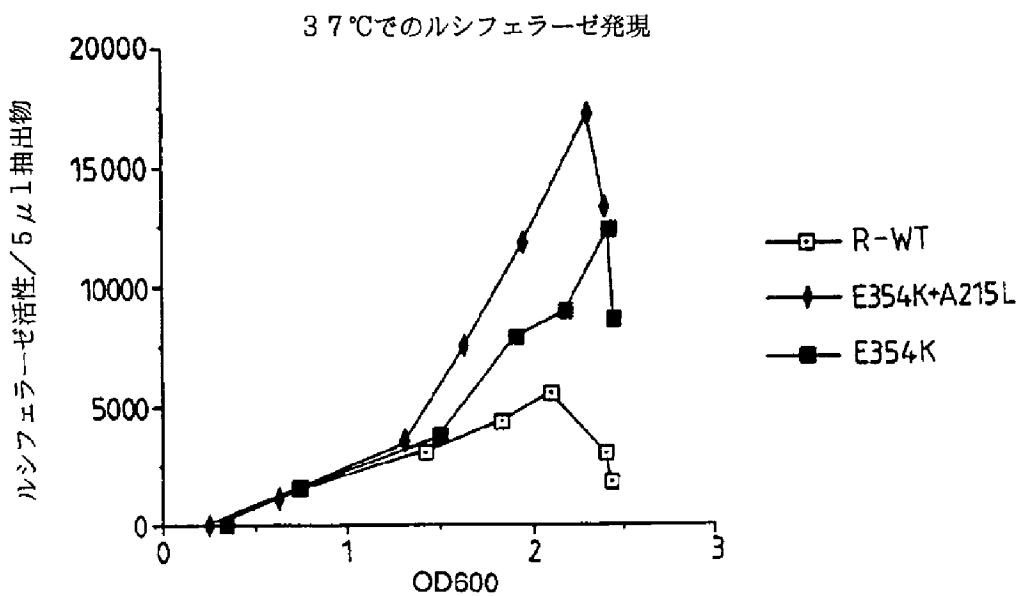
Fig.11.

【図12】

Fig.12. 37°Cにおけるルシフェラーゼの安定性

【図13】

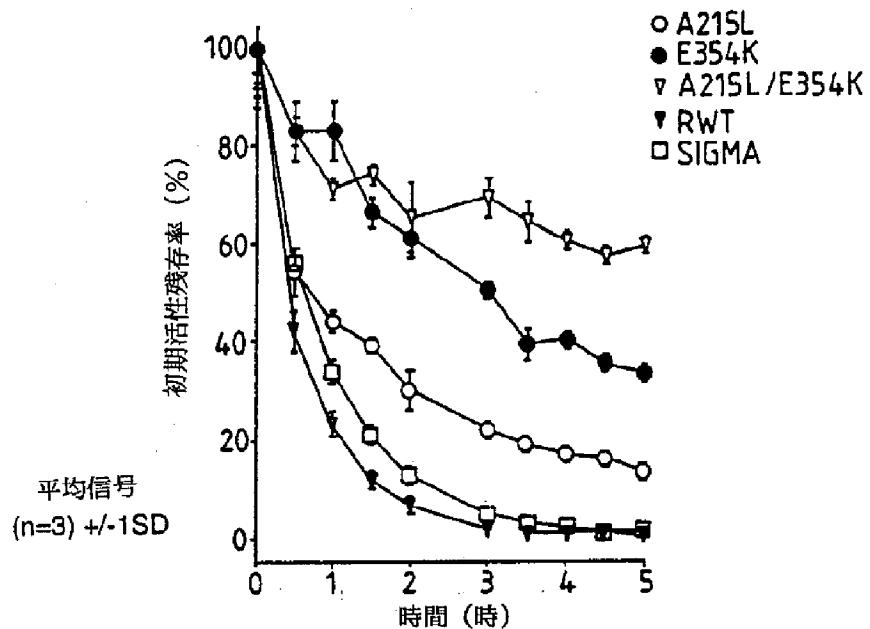
Fig.13.



【図14】

Fig.14.

37°Cにおけるルシフェラーゼ突然変異体の安定性

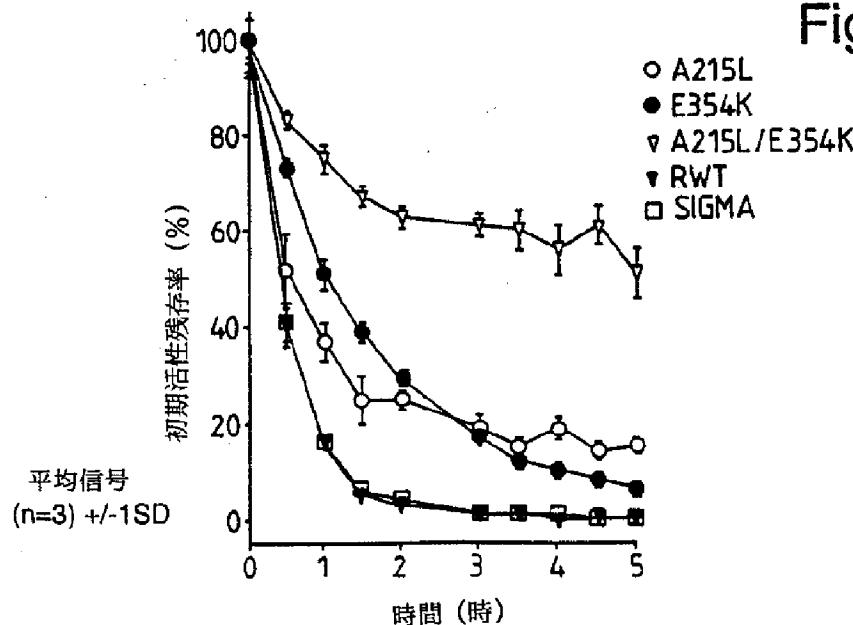


1% BSA及び0.02%アジドを含有するpH 7.75の
HEPES中に10ng/mlの酵素

【図15】

37°Cにおけるルシフェラーゼ突然変異体の安定性

Fig.15.



1% BSA及び0.02%アジド、2mM EDTA及び2mM DTTを
含有するpH 7.75のHEPES中に10ng/mlの酵素

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inter. nat. Application No PCT/GB 95/00629									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/53 C12N9/02 C01N33/50 C12Q1/68 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N G01N C12Q											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>EMBL Database, Accession No.: X65316, Identification: CVPGEMLUC, Promega cloning vector pGEM-luc see bp 693-695 ---</td> <td>1-5, 7-13, 15, 16, 22</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>EP,A,O 524 448 (KIKKOMAN CORPORATION) 27 January 1993 cited in the application see the whole document -----</td> <td>22</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	EMBL Database, Accession No.: X65316, Identification: CVPGEMLUC, Promega cloning vector pGEM-luc see bp 693-695 ---	1-5, 7-13, 15, 16, 22	X	EP,A,O 524 448 (KIKKOMAN CORPORATION) 27 January 1993 cited in the application see the whole document -----	22
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	EMBL Database, Accession No.: X65316, Identification: CVPGEMLUC, Promega cloning vector pGEM-luc see bp 693-695 ---	1-5, 7-13, 15, 16, 22									
X	EP,A,O 524 448 (KIKKOMAN CORPORATION) 27 January 1993 cited in the application see the whole document -----	22									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.									
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 14 July 1995	Date of mailing of the international search report 01.08.95										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Espen, J										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International Application No	
Information on patent family members			PCT/GB 95/00629	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0524448	27-01-93	US-A- 5229285 JP-A- 5244942	20-07-93	24-09-93

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 12 Q 1/68

G 01 N 33/50

//(C 12 N 1/21

C 12 R 1:19)

(C 12 N 9/02

C 12 R 1:19)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
 , CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
 TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG),
 AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C
 H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB
 , GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
 LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, M
 W, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU
 , SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US,
 UZ, VN

(72) 発明者 ホワイト, ピーター・ジョン

イギリス国、ケンブリッジシャー・シー
 ピー・2・1・キュー・ティー、ケンブリ
 ツジ、テニス・コート・ロード、ユニバー
 シティ・オブ・ケンブリッジ(番地なし)

(72) 発明者 マリイ, ジエイムズ・オーガスタス・ヘン
 リー

イギリス国、ケンブリッジシャー・シー
 ピー・2・1・キュー・ティー、ケンブリ
 ツジ、テニス・コート・ロード、ユニバー
 シティ・オブ・ケンブリッジ(番地なし)

(72) 発明者 スキレル, デイビッド・ジエイムズ
 イギリス国、ウイルトシャー・エス・ピ
 ー・4・0・ジエイ・キュー、サリスベ
 リ、ポートン・ダウン、シー・ビー・デイ
 ー・イー(番地なし)

F I

G 01 N 33/50

C 12 N 5/00

Z

B